

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>7</sup>

A61K 38/24

A61P 15/08

# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95107562.4

[45]授权公告日 2001年8月1日

[11]授权公告号 CN 1069062C

[22]申请日 1988.6.25 [24]颁证日 2001.5.2

[21]申请号 95107562.4

分案原申请号 88103966.7

[30]优先权

[32]1987.6.26 [33]IT [31]48110/A/87

[73]专利权人 切萨雷·西罗诺公司研究院

地址 意大利阿德

[72]发明人 朱塞佩·阿帕亚 塞雷纳拉·塞拉尼

安东尼诺·塞那

[56]参考文献

EPO161063A1 1985.11.13 A61K37/38

GB2174600A 1986.11.12 A61D7/00

SU618113A 1978.6.22 A61K37/38

审查员 马文霞

[74]专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 陈文青

权利要求书1页 说明书16页 附图页数3页

[54]发明名称 促卵泡激素的用途

[57]摘要

本发明涉及一种包括 $\alpha$ 亚基和 $\beta$ 亚基的促卵泡激素在制备治疗不育综合症的药剂中的用途,所述的促卵泡激素的FSH比活性不低于6200I.U./mg冻干粉末,实质上没有可检测到的痕量促黄体激素和其它尿蛋白。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4



## 权 利 要 求 书

1. 一种包括  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基的促卵泡激素在制备治疗不育综合征的药剂中的用途, 其中  $\alpha$  亚基是促性腺激素  $\alpha$  亚基,  $\beta$  亚基具有下列氨基酸顺序:

Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu  
Lys Glu Glu Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr  
Trp Cys Ala Gly Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr  
Lyr Asp Pro Ala Arg Pro Lys Ile Gln Lys Thr Cys Thr  
Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg Val Pro Gly  
Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val  
Ala Thr Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser  
Thr Asp Cys Thr Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys  
Ser Phe Gly Glu Met Lys Glu

所述的促卵泡激素的 FSH 比活性不低于 6200I. U. /mg 冻干粉末, 实质上没有可检测到的痕量促黄体激素和其它尿蛋白。

2. 如权利要求 1 所述的用途, 其中所述的药剂进一步包括合适的赋形剂。

3. 如权利要求 2 所述的用途, 其中所述的赋形剂是乳糖。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的用途, 其中所述的药剂是用于注射的冷冻药物制剂。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的用途, 其中所述的药剂是皮下给药的药剂。

6. 如权利要求 1 所述的用途, 其中所述的药剂的每安瓿瓶药中含有 75I. U. 的 FSH。

7. 如权利要求 1 所述的用途, 其中所述的药剂的每安瓿瓶药中含有 150I. U. 的 FSH。

8. 如权利要求 1 或 2 所述的用途, 其中所述的药剂进一步包括作为稳定剂的人体白蛋白。

# 说明书

---

## 促卵泡激素的用途

本申请是申请号为 88103966.7 的专利申请的分案申请。

本发明涉及促卵泡激素,含有它的药物组成物和它的纯化方法。

促卵泡激素已知对于不育症的治疗是有用的。含有这种激素的制剂已被在体内和体外的技术中采用以帮助受孕。人体 FSH 已经从人腺垂体和绝经后的人尿中分离出来了。最近,它已通过采用 DNA 重组技术而制备。

含有人体 FSH 的第一代商用产品含有 HMG (即, Pergonal<sup>®</sup> serono), 即从人体绝经后的尿中提取出来的人体绝经促性腺激素, 它它是 FSH、促黄体激素 (LH) 和其它的尿蛋白的混合物。同时, 有几种设想被用于得到科研和治疗用的纯 FSH 制剂。最近投入商用的 Metrodin (Serono) 产品是一种含有极少量 LH, 但含有其它尿蛋白的尿促卵泡激素 (尿 FSH) 制剂, 它被用于不育症的治疗。当不希望将 FSH 和外源 LH 一起用药, 如用于多囊卵巢综合症 (POOS) 时, 使用该产品是尤其好的。

至今, 不通过肌肉注射使用 FSH 进行治疗已经成功地进行了。因为肌肉注射通常要由医生或医护人员来进行, 病人要定期地去诊所或医院以便接受治疗。这就造成了大大的不方便。进一步地说, 因为治疗通常要延长到几星期以至几个月, 这样的治疗方法所花费的时间常常使得病人不乐意依从。

通过皮下注射而给药提供了由病人自己给药的可能性, 因而改善了病人的合作性和依从性。

人体绝经促性腺激素 (HMG) 的皮下给药已经被描述过 (Nakamura Y·等, 《生育和绝育》46(1):46~54, 1986), 它是关

于经过皮下蠕动泵，依靠脉动给HMG药而治疗女性不育症。因为在所用产品中有杂质存在，皮下注射具有要产生局部过敏反应的缺憾。因此，治疗须用悬浊液。

P·Roos(“人体促生育激素”《Acta Endocrinologica Supplementum 131, 1968)描述并说明了分别从冰冻垂体和绝经后的尿浓缩液中所得到的高纯度的垂体和尿的FSH制剂的特征。所得的每毫克垂体FSH中FSH活性的生物效价高达14,000国际单位(I·U·),每毫克尿FSH中FSH活性的生物效价为780 I·U·。在大多数活性垂体和尿制剂中LH污染量估计约为0.1% (重量)。纯化过程则包括如下一种或多种技术:在二乙氨基乙基纤维素上层析,在交联葡聚糖G-100上凝胶过滤、羟基磷灰石层析、聚丙烯酰胺凝胶电泳等等。

纯化的最好的FSH制剂的一种被Donini等描述过 [“从绝经后的尿中得到的FSH的纯化和部分化学物理特性”《Gonadotrophins and Ovarian Development》(二个学术会议的会议录),Livingstone, Edinburgh和London, 1970),且每毫克FSH生物效价为1255.6 I·U·,而每毫克LH中LH污染降低为3.2 I·U·。这种情况下,起始物质是人体绝经促性腺激素(HMG)制剂(注册商标为Pergonal),它就如上面所陈述的,是一种FSH和LH激素以及其它尿蛋白的混合物。结果产物是通过将起始HMG放在二乙氨基乙基纤维素上纯化,接着在二乙氨基乙基纤维素层析柱中层析,在交联葡聚糖G-100上凝胶过滤,最后,进行制备型聚丙烯酰胺凝胶电泳这样分批纯化而得到的。

H·Van Hell等通过在惯用的层析纯化步骤中增加免疫层析和凝胶过滤步骤而得到了很高的生物效价 [“人体尿FSH和LH的纯化和一些特性”《Gonadotrophins》(关于促性腺激素的国际性专

题讨论会1 记录, 1971), Wiley Interscience, 纽约]。为了达到从部分纯化的 FSH 片断中排除 LH 活性的目的, 免疫层析系采用抗 HCG 抗体偶联到琼脂糖上而进行。最好的纯化 FSH 片断中, 通过放射免疫测定法 (RIA) 分析得每毫克 FSH 中含有 4720 I·U· FSH, 而每毫克 LH 中 LH 污染低至 15 I·U·。

免疫层析的探讨业经由 Donini 等描述过 (“从 HMG 中纯化和分离 FSH 和 LH” 《Acta Endocrinologica》52, 186 ~ 198 页, 1966), 早在 1966 年, 他们就得到了每毫克 FSH 的效价为 329.7 I·U· 和生物学测不到的数量的 LH 污染的 FSH 制剂。在另一个实验中, 得到一片断, 分析得其每毫克 FSH 效价为 148.3 I·U·, 每毫克 LH 效价为 2.4 I·U·。因为在每毫克 FSH 效价为 329.7 I·U· 的制剂中没有进行放射免疫测定, 可以通过与 H·Van Hell (c.f. supra) 的结果相似来假定, 如果采用放射免疫测定, 将发现痕量的 LH。

即使最少量的 LH 污染的生理关系被 Donini 等揭示于一篇文章中 (“对于促黄体激素的生物测定的新探讨” 《Acta Endocrinologica》, 58, 463 — 472 页, 1968), 该文揭示了一种新的 LH 检测的生物鉴定法, 它将一定剂量的生物纯的 FSH 制剂加上 LH 的恒定增量注入幼年的无创伤的小鼠中, 然后, 测定子宫的增重, 它作为 LH 活性的相应比例。采用这种方法, 当与 4.44 I·U· 的 FSH 一起注射时, 哪怕小至 0.068 I·U· 的 LH 也显示出可以增加子宫的重量。

这样就可清楚地看到, 完全没有 LH 活性的 FSH 制剂是治疗所需要的, 绝对纯的 FSH 制剂是期望的。

如上面所述的, 最近注册的产品 Metrodin® (Serono) 是一种纯化的 FSH 制品, 它是通过一种大体与 Donini 等在一篇上面谈到的文章 (《Acta Endocrinologica》, 52, 186 ~ 198 页, 1966) 中所

描述的基本上相同的方法所制备。具体的量的控制与所说的制剂的生物纯度相一致，为每 75I·U· 的 FSH 中 LH 不大于 0.7 I·U·，即接近生物测定的灵敏度极限。但是，在一些治疗应用中，期望绝对地没有 LH。进一步地，在 Metrodin 中，人体 FSH 还伴有大量其它的尿蛋白，即它不是化学纯的 FSH 制品。

第 2,173,803 A 号英国专利申请中提出了另一种从垂体糖蛋白激素中纯化 FSH 的方法。该法坚持首先形成一激素与固定的单克隆抗体的复合物，然后用一个 pH 值 3~4 的酸性缓冲液洗提激素。尽管 FSH 被考虑了，然而所得到的高纯度的激素仍含有 0.1% (重量) 的 LH 和 0.5% (重量) 的 TSH。

Scott C·Chappel 等在一篇综述中 (《Endocrine Reviews 4(2), 179—211, 1983) 描述了 FSH 的微相不均匀性以及伴随着 FSH 分子的碳水化合物部分的生理重要性。该假设可以提出，即在代谢途径进行到最后的尿分泌时，一些诱发变异可能发生，这是因为由申请人进行的实验所用的本发明的 高纯度尿 FSH (hpu FSH) 制剂和用于比较的高纯度垂体 FSH 制剂之间，所具有的理化特性不同。同步或滞后转译而诱发变异显示了 FSH 由两种不同的糖基化和已知为  $\alpha$  和  $\beta$  亚基的非共价多肽链组成的糖蛋白的微观变异差别的基础。 $\beta$  亚基将它的生物特性赋予分子。

顺便说及，有一些类似的文章均希望解释在高纯度垂体和尿 FSH 制剂之间每毫克生物活性的值的实质性不同。一个合理的假设也是取决于碳水化合物部分的关连，更具体地说，取决于末端唾液酸残基的作用。

应该注意，尽管垂体 FSH 和尿 FSH 两者均定义为“FSH”，但目前尚无确切的依据来证实从两种来源中分离出来的分子是否相同或是否化学上是等效的。

业已发现，人体尿 FSH 可以从浓缩的绝经后的尿中分离出来，

按这样的纯化方法,最终的FSH无任何可测定的痕量LH和其它尿蛋白。进一步并与任何已知情况相反,对于本发明的尿FSH的氨基酸分析显示了一种新的FSH的111个氨基酸的 $\beta$ -亚基代替已有技术中所揭示的118或108个已知的FSH $\beta$ -亚基。更具体地说,本发明提供了一种新的FSH $\beta$ -亚基,其氨基酸序列如下:

```

Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Tht Ile Ala Ile Glu
Lys Glu Glu Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr
Trp Cys Ala Gly Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr
Lyr Asp Pro Ala Arg Pro Lys Ile Gln Lys Thr Cys Thr
Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg Val Pro Gly
Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val
Ala Thr Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser
Thr Asp Cys Thr Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys
Ser Phe Gly Glu Met Lys Glu

```

以及提供了一种含有已知促性腺激素 $\alpha$ -亚基和上面所定义的111个氨基酸 $\beta$ -亚基的新的蛋白质。该蛋白质具有促卵泡激素(FSH)的生物活性。较佳地为呈糖化物的形式。更佳的是它基本上无可测得的痕量促黄体素和其它尿蛋白。

本发明的又一个方面是一种含有本发明的纯化蛋白质和一种药理学可接受的赋形剂的药物组成物。较佳地为该组成物以适于皮下给药的形式存在。业已发现,本发明的药物组成的皮下注射不会增加通常由于注射已有技术的FSH制剂而出现的过敏反应。

根据本发明的又一个方面,本发明提供一种用于制备本发明的新的和高纯度的FSH的方法。该方法基本上依靠免疫纯化步骤和逆相高压液相色谱(HPLC)的结合。免疫纯化步骤中使用固定化的单克隆抗体,就如在上述第2,173,803A号英国专利申请中所描述的,但有一个很重要的不同是以免疫复合物中洗提FSH是在比较更高的

pH值下进行的。

在本发明的过程中，洗脱通常采用 pH值高于10和摩尔浓度大于0.5的水溶液进行。由申请人所进行的实验表明，在这些条件下，固定化抗体实质上并不是钝化的。这与上述英国专利申请中所述有显著不同，该申请揭示（第1页，36~37行）“使用高 pH值的洗提剂实际上是不合适的，因为它会导致抗体迅速钝化”。

这些方面的不同可能取决于将抗体连接到树脂上的方法的不同。

根据本发明，洗脱液的 pH较佳地为高于11，更佳地是在11.3~11.7的范围内。

摩尔浓度的值较佳地为大于0.8，更佳为约1。

用于本发明的合适的洗脱液是氨、二乙酰胺以及诸如 TRIS 缓冲液这样的缓冲液。甘氨酸-NaOH 等等。

随后的逆相高压液相色谱（HPLC）步骤使可以得到完全除去沾染任何蛋白质的产物。除去的方法不是仅采用免疫纯化步骤，如在英国专利申请中所述的。这样的步骤不仅有效地除去了含有蛋白质的痕量残渣，而且保持了 FSH 所有的生物活性，这样的事实对于 P·Hallin 和 S·A·Khan（《J·Liq·Chromat·》9(13), 2855-68, 1986）的文章中的观点来说是新奇的，因为该文认为进行逆相 HPLC 后，牛 FSH 和人体 FSH 的生物活性就会失去。另一方面，该文揭示了当人体尿制剂（即含 FSH 和 LH 两者）进行离子交换 HPLC 后，生物活性物令人满意地得到回收，但是，有部份分离。

HPLC 步骤后，FSH 采用通常的技术再处理。为了贮藏和/或运用的目的，产品可以被冻干。另一些适宜的方法是将产品有效地浓缩，稳定或进行其他处理，它们是可以考虑的。

很明显，绝经后尿的可用性大于人体垂体的可用性。这种相应的

可用性对于申请人的发明是很重要的。

本发明的过程中使用的对 F S H 专一性单克隆抗体可采用已知的技术制备。

在一个典型的实例中，剑桥大学的杂交细胞株 9/14 被进行其对于 F S H 的最佳亲和力的筛选。单克隆抗体采用细胞培养技术在上清液培养基中而制备，并通过 50% ( W / V ) 硫酸铵的盐分级分离而纯化，然后，进行离子化的逆相色谱和 H P L C 凝胶过滤并渗析。

如上所述由细胞株 9/14 制备的单克隆抗体和纯化的详细说明如下：

- a) 蛋白质纯度：不小于 90%
- b) 免疫球蛋白的分级： I g G 1
- c) 亲和力常数： $3.5 \times 10^8 \text{ L} \cdot \text{mole}^{-1}$
- d) 特征：

抗原	杂交反应
F S H	100
H C G	1
H C G— $\beta$ 亚基	1
L H	1
T S H	1

- e) 在溶液中对于 F S H 的亲和力：每毫克单克隆抗体约 1,000 I · U · 的 F S H。

F S H 专一性单克隆抗体根据 J · Porath 在《Methods in Enzymology》34, 13—30 页, 1974 中所描述的方法，通过二乙烯基砜而化学地结合到琼脂糖 4 B 上。

在一个典型的实例中，1 升琼脂糖 4 B 首先置于多孔玻璃过滤器上，用 5 升新鲜蒸馏水洗涤，然后，用 5 升 1M 的碳酸钠洗涤 (p H 11)

。洗涤后的琼脂糖悬浮于1升1 M的碳酸钠(pH11)中。在持续搅拌下滴加入200ml 二乙烯基砵。在室温就下进行反应70分钟,然后加入1 NHCl(至pH7.0)使反应停止。

活化的树脂悬浮于1升含有2克抗FSH单克隆抗体的0.25M的碳酸氢钠中以使90%以上的抗体结合到活化树脂上。这样得到的免疫树脂于4℃下贮存。

如下实例1列举了采用商用HMG,即Pergonal<sup>®</sup> Serono中的活性成分的本发明的方法的两个纯化步骤。

可以理解,尽管HMG是本发明过程中较佳的初始物料,然则本发明也可以采用低纯度的物料,如绝经后的尿浓缩液等等。使用每毫克仅含1 I·U·FSH的尿浓缩液作初始物料已经得到了很好的结果。

本发明的另外一些方面和优点在考虑了下列实例后将变得更为明显,但它并不限于此。

实例1: 高纯度尿FSH(hpu FSH)的制备

步骤1: 在抗FSH的Mc Ab—DVS—琼脂糖上的免疫纯化  
HMG被用作起始原料。

将免疫树脂抗FSH Mc Ab—DVS—琼脂糖于0.1 M Tris-HCl, 0.3M NaCl的缓冲液中平衡,pH=7.5,4℃。

往层析柱中加入相当于结合的FSH总量的80~90%的IUFSH(RIA)。

未被滞留蛋白质用平衡缓冲液洗涤至洗出物的OD<sub>280</sub>值小于0.02。

于4℃下,用1 M的氨溶液将吸收的uFSH从免疫树脂中洗脱出来。所收集的氨洗出液的量约为免疫树脂体积的4倍,在4℃,加入冰醋酸尽快将溶液pH调整到9.0,溶液在Amicon设备(膜C·D·10,000Ds)超滤并浓缩到很小的体积。

## 步骤2: 逆相 H P L C

最终的溶液调节  $pH=5.6$ , 加入  $C_{18}$  逆相层析柱 (Pre Pak Waters), 该柱事先在室温下用  $0.05M$   $pH=5.6$  的醋酸铵缓冲液平衡。

洗脱液的流速为  $100ml/min$ , 且在  $280nm$  下监测。

H P L C 纯化采用一配有紫外检测器和制备型梯度产生器的 Prep 500 A 设备 (Waters) 进行。

在流动相中异丙醇高达  $50\%$  的梯度洗脱下将生物活性的高纯度尿 F S H 洗脱出来。级分用 G P C 和 R I A 分析检验。

在真空、 $40^{\circ}C$  下蒸发除去有机溶剂, 然后将溶液冷冻并冻干。

## 实例2: F S H 的特性

将本发明的高纯度尿 F S H 制剂进行几个理化、生物和免疫方面的测试以获得它的完整的特性。如在下面所指出的, 大多数试验均以下面所描述的方法而得到的高纯度垂体 F S H 作对比。

粗的人垂体抽提物 (H P G), 是由人体生长激素抽提中所得到的副产品, 被用作初始原料。

整个过程包括如下步骤:

- 1) 用含  $6\%$   $pH=5.6$  的醋酸铵的  $40\%$  的乙醇抽提粗 H P G, 上清液用  $96\%$  冷乙醇进行沉淀而进行初级纯化。
- 2) 在二乙氨乙基纤维素上, 用  $0.15M$   $pH=7$  的乙酸钠作为洗脱剂进行离子交换层析, 然后用  $96\%$  冷乙醇沉淀而进一步纯化。
- 3) 在交联葡聚糖 G-100 上, 用  $0.05M$  碳酸氢钠作为缓冲液进行 F S H 级分的凝胶过滤而进一步纯化。
- 4) 在 S P- 交联葡聚糖 C50 上进行离子交换层析, 用  $0.1 M$  磷酸盐缓冲液 ( $pH 6.2$ ) 洗脱后再冷冻干燥得到最后一步纯化的垂体 F S H。

垂体 F S H 在体内的生物专一活性被测定为  $4770 I \cdot U \cdot F S H$

1 毫克冻干粉未 ( Steelman-pohley试验, 2级 I R P—H M G的 I · U · ), 测定方法是采用“生物分析”中描述的。

特性试验进行如下:

### LH污染

试验借助于专一性 LH放射免疫分析法进行: 用以2级 I R P—H M G作对照标定的标准 LH和<sup>125</sup>I—LH为示踪物, 两者均包含在 Biodata<sup>®</sup>公司最近注册的 L H ter K I T (10204号) 中。由申请人制备的羊抗—H C G抗血清作为抗血清被使用, 它对 LH具有100%的交叉反应性, 而对于 F S H则小于0.1%。

R I A分析过程是遵循每一个制造商的说明去所做的, 得到的结果是在根据实例1 制备的高纯度尿 F S H中没有可测出的 LH污染。

上述的结果使用一名为 D E L F I A (分离—强化镧荧光免疫检测器) 由 L K B—Pharmacia注册的更为灵敏的检测器检测而得到证实。

### 十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳 ( S D S—P A G E )

根据 Laemmli在《Nature》227, 68—685页(1970)中所描述的过程, 在减压条件下, 用13.5% p H=8.8的聚丙烯酰胺凝胶在 S D S中进行平板凝胶电泳。

用0.25% 库玛斯亮兰 R-250在25% 甲醇/75%乙酸溶液中进行染色。

将如上所描述的方法所得到的本发明的hpu F S H制剂和高纯度垂体 F S H制剂进行上述试验。结果列于图1中, 尿 F S H和垂体 F S H制剂 (依次为u F S H和p F S H) 的带区与分子量的标志带区 ( M . W ) 一起显示。

在u F S H和p F S H制剂中, 发现糖蛋白典型主色带均在接近20,000道尔顿的同样分子量, 它也符合文献的数值。从糖蛋白在 S D S—凝胶电泳的已知特性来看, 这个值只有很小的过高估计。

## 尺寸大小的排阻层析

hpu F SH和hpp F SH的分析在 T S K G 2000 S L K B 柱中进行。用 0.1 M pH 6.8 的磷酸缓冲液加 0.2 M NaCl 作为洗脱液，流速为 0.7 ml/分，读数在波长 230 毫微米 nm 时取得。

结果列于图 2 中，它显示了 u F SH 和 p F SH 每一个主波峰具有大致相同的滞留时间（分别为 13.37 和 13.55 分钟）。

## 等电(点)聚焦

等电(点)聚焦在固定于 11.5% (W/V) TCA 和 3.5% (W/V) 磺基水杨酸上的含 5% 聚丙烯酰胺凝胶薄层上进行，用银染色装置 (BIO-RAD) 进行染色。

hpp F SH 和 hpu F SH 的结果均列于图 3 中，图 3 也显示了等电点的标记。从图中可以看出，尿 F SH 和垂体 F SH 都显示了几个带区，但它们的类型是绝然不同的，尤其是，尿 F SH 的主带区在 pH 低于 4.8 的区域，而垂体 F SH 所显示的主带区在一个较高的 pH 范围内。

这个试验表明尿 F SH 和垂体 F SH 是两种不同的分子，如果不是它们各自的蛋白质部分不同，那么至少就是它们的碳水化合物部分有所不同。

## 生物鉴定

hpu F SH 的 F SH 在体内的生物活性采用 Steelman pohley 方法 (《Endocrinology》53, 604-616, 1953) 测定，采用 HMG House 标准校准的 2 级国际参考 HMG 制剂作为对比材料用于生物鉴定。该鉴定系被测定 F SH 生物活性的国际单位 (I. U.) 的所有主要药典和保健协会所认可。

经测定，根据上述实例所制备的 hpu F SH 制剂的 F SH 的比活性为 6200 I. U./毫克冻干粉末，即：这是已描述的 F SH 尿制剂的

最高的比活性。

氨基酸序列的测定

a) U F S H亚基的分离法

u F S H亚基的分离系采用配有一层析柱: Aquapore R P-300, 200 × 4.6mm, 7 μm (Brownlee Labs) 的 Waters H P L C体系进行。

洗脱剂是 A=0.1% T F A (三氟乙酸, H P L C级, Pierce), B=0.055% T F A (在乙睛中)。流速为 1ml/min, 温度为 35°C, 初始状态下为 15% B。

20分钟时, 梯度上升为 40% B。

紫外检测是调节在 229nm 进行。

通常用 20 (微升 μl) 分析器注入 0.5mg/ml 的 hpu F S H 溶液和 0.5% T F A。在 T F A 溶液中预保温不是必需的。

制剂的分离采用同样的柱进行。

注射 0.5mg 溶解于 A 缓冲液中的 hp 人体 u F S H (批号 032) 可得到很好的分离。级分用手工收集, 采用 Speed Vac 浓缩器干燥。亚基溶于水中, 采用 H P L C 分析, 并贮存于 -20 °C。

约 10.5 分钟, β 亚基被洗脱, 波峰很宽, 15 分钟时, α 亚基被洗提, 波峰很窄。

对于 β 亚基和 α 亚基的每一个波峰的认识是通过专性 R I A 方法来完成的。

通常, β 亚基的回收率为 50% 左右, 而 α 亚基的回收率则为 90% 以上。

b) α 和 β 亚基的还原和羧甲基化

如 (a) 中所分离的亚基的还原在 0.5 M 三(羟甲基) 甲胺 (Tris)、0.1% E D T A、6 M (pH 8.5) 盐酸胍中, 37°C 下进行 2 小时, 使用 15 倍摩尔过量于半胱氨酸含量的 D T T (二硫苏糖醇, Serva)。

然后，往反应混合物中加入碘乙酸钠(2.1克分子过量于DTT)，并在黑暗中保持30分钟。

要使反应停止可加入1%巯基乙醇和TFA。

羧甲基化的亚基采用HPLC纯化。

B羧甲基化亚基难溶于水，故最终的产量很低。

#### c) $\beta$ 亚基的还原、吡啶乙基化和胰蛋白酶消化

在a)中所分离的 $\beta$ 亚基的还原在室温下，以下列方式进行2小时：

0.1mg  $\beta$ 亚基

0.5ml 0.5 M Tris, 0.1% EDTA, 6 M的盐酸胍 pH8.5

2.7mg 二硫苏糖醇。

吡啶乙基化是通过将0.02ml 4- 乙烯基吡啶加入到前述的溶液中进行而进行的。

反应在室温下进行2小时。最后，反应混合物放于用0.1%TFA平衡的C4软片(Baker)上。

软片用0.1%TFA洗涤，吡啶乙基化的 $\beta$ 亚基用40%乙晴、0.1%TFA洗脱。洗出的级分被干燥，并用HPLC法纯化，如前面所述的对 $\beta$ 亚基的处理。

用HPLC预纯化的吡啶乙基化 $\beta$ 亚基被溶解于1% $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 中，pH=8。

将胰蛋白酶加至溶液中，反应在37℃进行1.5小时。

胰蛋白酶级分采用与前面所描述的同样的方法进行纯化，除了梯度在30秒内从0%变为55%，且紫外检测在214nm进行。

胰蛋白酶级分采用与所报导的用于亚基顺序化的同样的方法进行顺序化(可见e))。

#### d) $\alpha$ 亚基的顺序分析

几个顺序分析测定(runs)使用 $\alpha$ 亚基、羧甲基化 $\alpha$ 亚基或完整的

高纯度人体 u F S H 来进行，通常以 5 纳摩尔或更少的量加入蛋白质顺序分析仪 (470 A, Applied Biosystem)，并采用生物体系中所使用的 03 R P T H 标准程序表 (由 Applied Bioystem 提供) 或专一的循环顺序，即使被专一循环 03 C P R O 取代的脯氨酸或甘氨酸断裂开来。

从分子的 NH<sub>2</sub> 末端起的头 45 个氨基酸被测定，结果证实了和文献中 [《J. Biol. Chem.》250, 6735 (1975)] 已知的氨基酸顺序符合。

从已知顺序的丙氨酸开始的 52 位和 78 位的天门冬酰胺是产生糖基化的氨基酸。

在 NH<sub>2</sub> 末端总是存在异种性，这在所有的顺序样品中都是相同的。在链中，完整的分子 (即从丙氨酸开始的) 占 65%，而缺少二个氨基酸 (即从天门冬氨酸开始) 的分子占 5%，而缺少头三个氨基酸 (即从缬氨酸开始) 的分子占 30%。

	1				5
链的 65%	Ala	Pro	Asp	Val	Gln... ..
链的 5%			Asp	Val	Gln... ..
链的 30%				Val	Gln... ..

α 亚基的异种性。

#### e) β 亚基的顺序化

几个顺序化均采用 β 亚基、羧甲基化 β 亚基、完整的高纯度人体 u F S H 和吡啶乙基化 β 亚基的胰蛋白酶肽。

样品被加入到蛋白质顺序分析仪 (470 A, 生化体系中用的), 采用生化体系中所使用的 03 R P T H 标准程序表。

结果表明 β 亚基为 111 个氨基酸长度，且具有下列的氨基酸顺序。

Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Tht Ile Ala Ile Glu  
 Lys Glu Glu Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr  
 Trp Cys Ala Gly Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr  
 Lyr Asp Pro Ala Arg Pro Lys Ile Gln Lys Thr Cys Thr  
 Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg Val Pro Gly  
 Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val  
 Ala Thr Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser  
 Thr Asp Cys Thr Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys  
 Ser Phe Gly Glu Met Lys Glu

从上述顺序的位置 1 的天门冬酰胺起的 7 和 24 位置上的天门冬酰胺是发生糖基化的氨基酸。

在  $\beta$  亚基的 NH 末端总是存在异种性，这与所有的顺序化样品是一样的。完整的分子（即从天门冬酰胺开始的）占链的 35%，缺少第一个氨基酸（即从丝氨酸开始的）分子占 15%，缺少头二个氨基酸（即从半胱氨酸开始）的分子占 50%。

	1				5
链的 35%	Asn	Ser	Cys	Glu	Leu.....
链的 15%		Ser	Cys	Glu	Leu.....
链的 50%			Cys	Glu	Leu.....

$\beta$  亚基的异种性。

### 实例 3: 药物制剂

含有本发明中所制得的 hpu FSH 的药物制剂的生产不是很困难的。主旨是在冻干后仍保持它的生物活性，这样以于注射用的制剂是较佳的形式。冷冻含有 hpu FSH 的制剂可使用生理盐水和/或其它合适的稀释剂重建，以形成可以注射的溶液。

一些赋形剂可以适宜地用于组成中，作为组成的一部分，这样的赋形剂如：甘露醇、乳糖、甘氨酸、葡萄糖、蔗糖和它们的混合物。另外，一些常用的载体，填充剂等也可使用。混合物是合用的。

在本发明所进行的实验中，乳糖被用作可以注射用的制剂的赋形

剂。

在制备可注射用的配方时，较佳地是通过加入常用的酸性物或碱性物来调节 pH。酸性物包括乙酸等。碱性物包括氢氧化钠等。也可使用混合物。

一种或多种稳定剂，如白蛋白等的使用是期望的。

用于制造20,000瓶针剂，且每瓶含有75 I. U. FSH的药物生产的典型例子如下。

计算出的一定量（以生物活性为单位）的冻干 FSH 粉末块溶解于注射用的700ml 冷的无热原的水中。如果需要的话，可能用乙酸或氢氧化钠将 pH 重新调整到6.2 和6.8,本申请中可能这样。然后将溶液经过0.2 微米孔径的过滤器进行无菌过滤。

将200g乳糖溶解于2 升注射用的无热原的水中，如上所述进行无菌过滤，并加入到 FSH 溶液中。

注射用无热原 的水加到最后体积达15升。溶液被分放入安瓿瓶中（每瓶0.75ml）并在无菌冷冻室中冷冻。

所得到的安瓿瓶 中每瓶含75 I. U. FSH和10mg乳糖。

在一个较佳具体例中，安瓿瓶中的药剂可以含有150 I. U. FSH。

根据药物制剂的又一个实例，除赋形剂乳糖外，所制得的安瓿瓶药剂中还含有1mg 人体白蛋白作为稳定剂。

尽管本发明通过一些特例而列举了，但可以理解，在不违背本发明的宗旨和范围的情况下，可以作出各种变化。

# 说明书附图

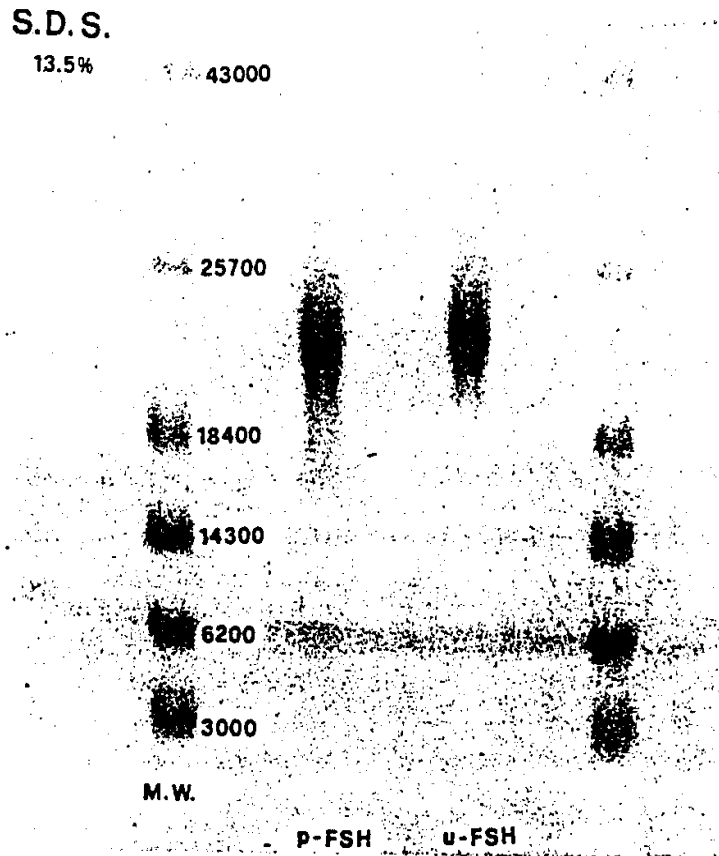
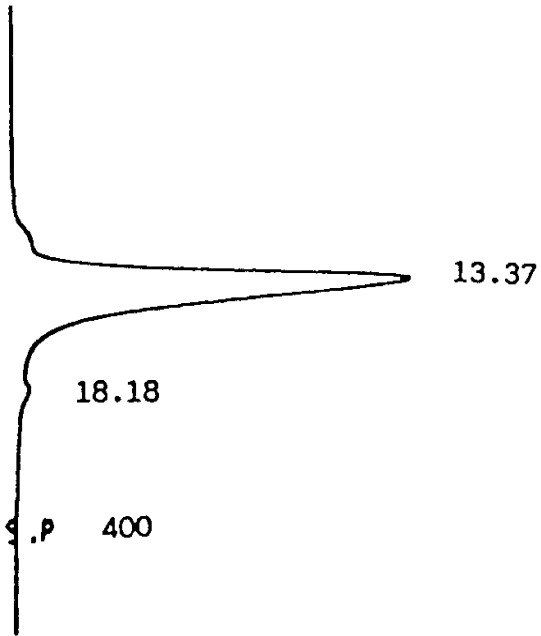


图 1

uFSH



pFSH

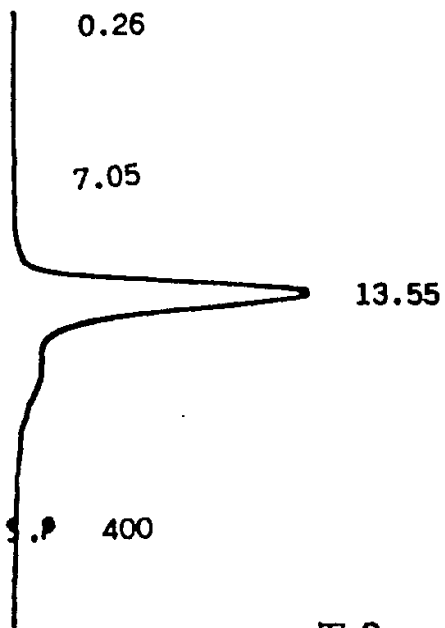


图 2

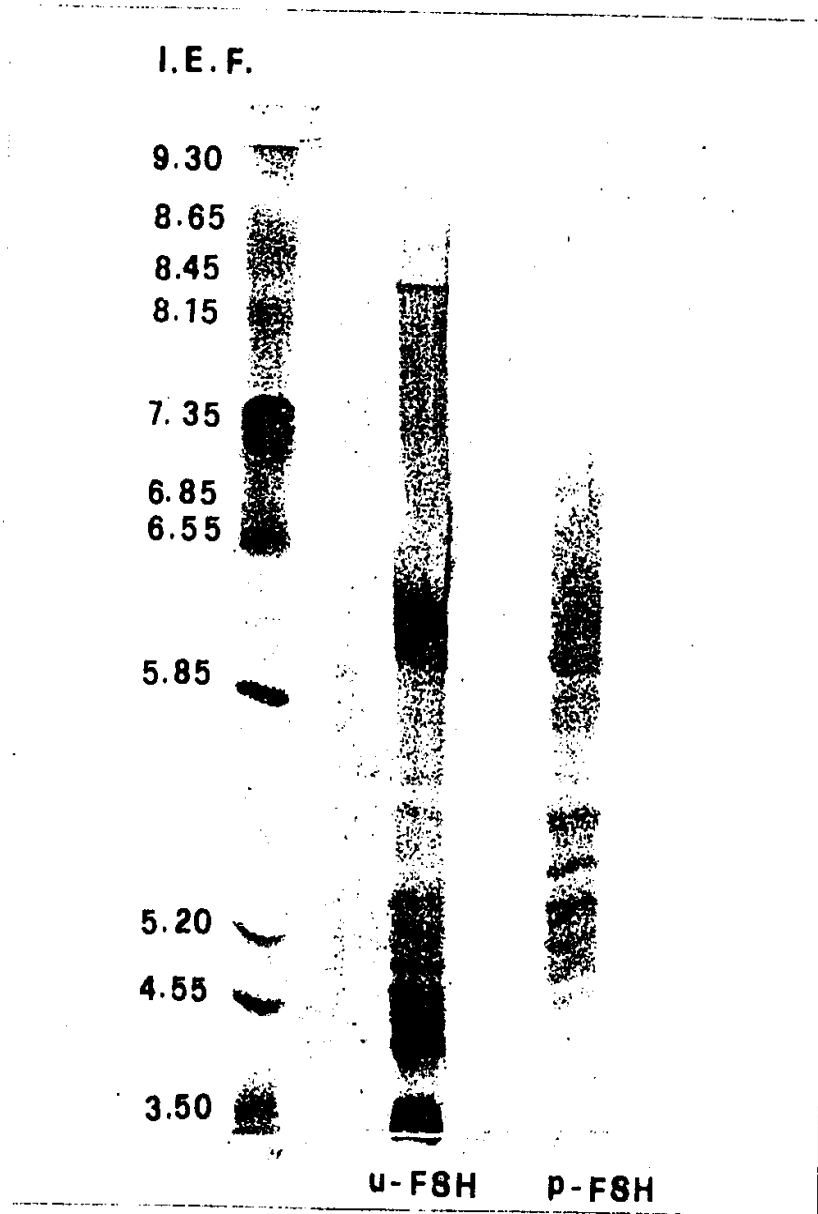


图 3